(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0029188
(43) 공개일자 2022년03월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01H 1/06 (2006.01) *A01H 5/10* (2018.01)
C07K 14/415 (2006.01) *C12N 15/82* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01H 1/06 (2021.01)
A01H 5/10 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2020-0111207
(22) 출원일자 2020년09월01일
심사청구일자 2020년09월01일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
이병하
서울특별시 마포구 성암로 91, 103동 705호
배노아
서울특별시 서초구 신반포로 32, 15동 302호
유시인
경기도 수원시 팔달구 고화로62번길 19-4 그린캐슬 204호
(74) 대리인
최규환

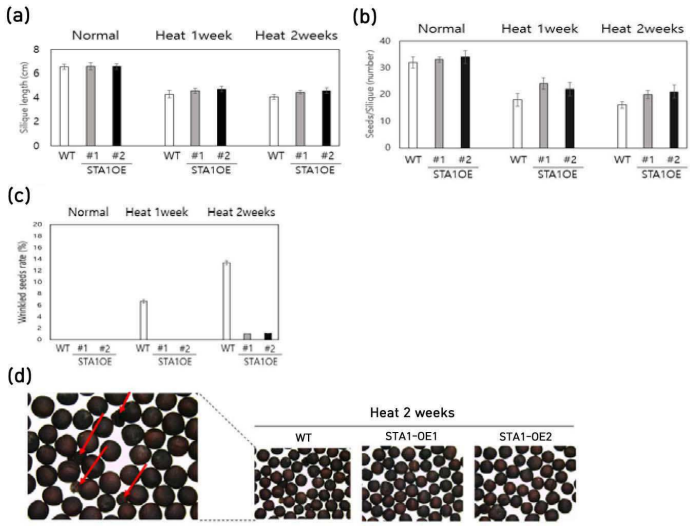
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **고온 스트레스 조건에서 식물체의 종자 발달 및 화분 생존율을 조절하는 애기장대 유래 STA1 유전자 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 고온 스트레스 조건에서 식물체의 종자 발달 및 화분 생존율을 조절하는 애기장대 유래 *STA1* (*Arabidopsis thaliana STABILIZED1*) 유전자 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 STA1 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물 세포를 형질전환시켜 상기 STA1 단백질 코딩 유전자의 발현을 증가시켜 비형질전환 식물체에 비해 고온 스트레스 조건에서 정상 종자 발달률 및 화분 생존율을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
C07K 14/415 (2013.01)
C12N 15/8205 (2013.01)
C12N 15/8267 (2013.01)
C12N 15/8273 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1395062973
과제번호 PJ013301
부처명 농촌진흥청
과제관리(전문)기관명 농촌진흥청
연구사업명 차세대바이오그린21(R&D)
연구과제명 환경스트레스 저항성 유채 개발을 위한 Small RNA processing 조절인자의 분자유전학적 활용 연구
기 여 율 1/1
과제수행기관명 서강대학교
연구기간 2018.01.01 ~ 2020.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 STA1 (STABILIZED1) 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물 세포를 형질전환시켜 STA1 단백질 코딩 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는, 고온 스트레스 조건에서 식물체의 정상 종자 발달률 및 화분(pollen) 생존율을 조절하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 STA1 단백질 코딩 유전자를 과발현시켜 비형질전환 식물체에 비해 고온 스트레스 조건에서 식물체의 정상 종자 발달률 및 화분 생존율을 증가시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 STA1 (STABILIZED1) 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물 세포를 형질전환하는 단계; 및

상기 형질전환된 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계;를 포함하는, 고온 스트레스 조건에서 식물체의 정상 종자 발달률 및 화분(pollen) 생존율이 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 애기장대 유래 STA1 단백질 코딩 유전자의 발현을 증가시켜 비형질전환 식물체에 비해 고온 스트레스 조건에서 정상 종자의 발달률 및 화분 생존율을 증가시키는 것을 특징으로 하는 형질전환 식물체의 제조 방법.

청구항 5

제3항 또는 제4항의 방법에 의해 제조된 고온 스트레스 조건에서 정상 종자의 발달률 및 화분 생존율이 조절된 형질전환 식물체.

청구항 6

제5항에 따른 식물체의 형질전환된 종자.

청구항 7

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 STA1 (STABILIZED1) 단백질 코딩 유전자를 유효성분으로 포함하는, 고온 스트레스 조건에서 식물체의 정상 종자 발달률 및 화분 생존율 조절용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 고온 스트레스 조건에서 식물체의 종자 발달 및 화분 생존율을 조절하는 애기장대 유래 *STA1* (*STABILIZED1*) 유전자 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 식물은 생장하면서 다양한 환경 스트레스에 노출되며, 작물의 생장, 발달 및/또는 수확량 등에 영향을 미친다. 그 중, 온도는 모든 식물의 생존에 영향을 미칠 수 있는 가장 중요한 요소 중의 하나로서, 작물의 생육과 발달에 주요한 원동력으로 작용한다. 최근 유례없는 폭염이 지속되어 고온 스트레스로 작물의 생육장해 피해가 발생되고 있다. 일반적으로 고온이 지속되면 농작물은 시듦, 병해충 증가, 생육 불량, 햇볕 데임 현상이 나타난다. 지구온난화에 따라 향후 한반도의 기온 상승은 가속될 것으로 전망되며, 2030년경에는 현재보다 2℃ 상승, 2065년경에는 현재보다 4℃ 상승하여 수도권 대부분이 아열대 기후대로 변화될 것으로 예측되고 있다. 이에, 고온

스트레스 내성을 가지는 작물의 개발에 많은 관심이 집중되고 있는 실정이다.

[0003] 유채는 양귀비목 십자화과의 두해살이풀로, 1962년부터 유료작물(油料作物)로서 본격적으로 재배되었다. 종자에는 38~45%의 기름이 들어 있는데, 15~20%의 가용성 질소질과 20% 가량의 단백질이 들어 있는 식용유로서 콩기름 다음으로 많이 소비하고 있으며, 깻묵은 사료나 비료로 쓴다. 종자에서 분리한 지방유를 연고기제(軟膏基劑)·유성주사약(油性注射藥)의 용제나 기계의 윤활유로 쓴다.

[0004] 한편, 한국등록특허 제1862755호에는 '식물의 환경 스트레스 내성을 증가시키는 애기장대 유래의 AtSIZ1 유전자 및 이의 용도'가 개시되어 있고, 한국공개특허 제2016-0057222호에는 '식물의 환경 스트레스 내성을 조절하는 AtLRK10L1.2 유전자 및 이의 용도'가 개시되어 있으나, 본 발명의 '고온 스트레스 조건에서 식물체의 종자 발달 및 화분 생존율을 조절하는 애기장대 유래 *STA1* 유전자 및 이의 용도'에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 애기장대 유래 *STA1* 유전자를 유채(*Brassica napus*) 작물에 도입하여 형질전환체를 제조한 후 고온 스트레스를 처리하고 정상 유채 식물체(비형질전환체)와 비교한 결과, 고온 처리 후 정상체의 경우 비정상적인 씨앗의 비율이 전체 씨앗의 10% 수준으로 확인되었으나, *STA1* 형질전환체의 경우 비정상적인 씨앗의 비율이 2% 수준에 불가하여 고온 스트레스 조건 하에서 정상적인 종자의 발달률이 정상 식물체에 비해 높은 것을 확인할 수 있었으며, 고온 처리 후 형성된 꽃을 조사한 결과 화분(pollen) 생존율 또한 *STA1* 형질전환체가 정상 식물체에 비해 현저히 우수한 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 STA1(STABILIZED1) 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물 세포를 형질전환시켜 STA1 단백질 코딩 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는, 고온 스트레스 조건에서 식물체의 정상 종자 발달률 및 화분(pollen) 생존율을 조절하는 방법을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 STA1 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물 세포를 형질전환하는 단계; 및 상기 형질전환된 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계;를 포함하는, 고온 스트레스 조건에서 식물체의 정상 종자 발달률 및 화분 생존율이 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 고온 스트레스 조건에서 정상 종자의 발달률 및 화분 생존율이 조절된 형질전환 식물체 및 이의 형질전환된 종자를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 STA1 단백질 코딩 유전자를 유효성분으로 포함하는, 고온 스트레스 조건에서 식물체의 정상 종자 발달률 및 화분 생존율 조절용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 식물은 갑작스런 온도 상승으로 인해 심각한 피해를 입을 수 있는데, 본 발명의 유전자를 이용하면 식물체에 고온 스트레스 저항성을 유도할 수 있으므로, 고온 또는 갑작스러운 기온 상승 지역에서도 안정적으로 재배할 수 있는 식물체의 개발에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다. 특히, 본 발명의 유전자는 고온 스트레스 조건에서 식물체의 생식생장과정에 영향을 미치므로, 열대 지역 또는 재배 기간 중 갑작스런 온도 상승 등에서 주요 농작물의 생산량 증대에도 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 정상 조건(명 조건에서 23℃ 16시간, 암 조건에서 18℃ 8시간)에서 재배한 비형질전환 유채(WT)와 애기장대 유래 *STA1* 과발현 형질전환 유채(STA1-OE)의 장각과 길이(a) 및 장각과 당 씨앗의 수(b)를 보여준다.

도 2는 고온 스트레스 조건(명 조건에서 23℃ 6시간 후 시간 당 2℃씩 증가하여 35℃ 4시간 처리한 뒤 18℃ 암 조건 8시간 처리; 1주 또는 2주 지속)에서 재배한 비형질전환 유채(WT)와 애기장대 유래 *STA1* 과발현 형질전환 유채(STA1-OE)의 장각과 길이(a), 장각과 당 씨앗의 수(b), 비정상적인 씨앗의 비율(c) 및 씨앗의 현미경 사진

(d)을 보여준다.

도 3은 고온 스트레스 처리(명 조건에서 23℃ 6시간 후 시간 당 2℃씩 증가하여 35℃ 4시간 처리한 뒤 18℃ 암 조건 8시간; 1주 또는 2주 지속) 후 형성된 비형질전환 유채(WT)와 애기장대 유래 *STA1* 과발현 형질전환 유채(STA1-OE)의 꽃을 Alexander 염색법을 이용하여 염색한 뒤 관찰한 화분의 현미경 사진(a)과, 화분 생존율 분석 결과(b)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 STA1 (STABILIZED1) 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물 세포를 형질전환시켜 STA1 단백질 코딩 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는, 고온 스트레스 조건에서 식물체의 정상 종자 발달률 및 화분(pollen) 생존율을 조절하는 방법을 제공한다.

[0013] 본 발명의 일 구현 예에 따른 조절 방법은 애기장대 유래 STA1 단백질 코딩 유전자를 식물 세포에서 과발현시켜 비형질전환 식물체에 비해 고온 스트레스 조건에서 식물체의 정상 종자 발달률 및 화분 생존율을 증가시키는 것을 특징으로 하나, 이에 제한되지 않는다. 상기 "유전자 과발현"이란 비형질전환 식물체에서 발현되는 수준 이상으로 상기 유전자가 발현되도록 하는 것을 의미한다.

[0014] 본 발명에 있어서, 상기 고온 스트레스 조건은 1일 3 내지 5시간 동안 32 내지 38℃의 온도에서 5 내지 16일 동안 식물체가 노출되는 것일 수 있고, 바람직하게는 1일 4시간 동안 35℃의 온도에서 7 내지 14일 동안 식물체가 노출되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0015] STA1 단백질은 splicing factor로서 RNA processing, small RNA 생산 및 후성유전학적 변화인 RNA-directed DNA methylation에 관여한다.

[0016] 본 발명의 일 구현 예에 따른 조절 방법에서, 상기 애기장대 유래 STA1 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0017] 본 발명에 따른 애기장대 유래 STA1 단백질의 범위는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 2로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다. "실질적으로 동질의 생리활성"이란 고온 스트레스 조건에서 식물체의 정상 종자 발달률 및 화분 생존율을 조절하는 활성을 의미한다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 애기장대 유래 STA1 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다. 본 발명의 상기 애기장대 유래 STA1 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 염기서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[0019] 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.

[0020] 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다. 용어 "발현 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다.

[0021] 본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를

숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예컨대, pLλ프로모터, trp 프로모터, lac 프로모터, T7 프로모터, tac 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 리보좀 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 대장균(*Escherichia coli*)이 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위, 그리고 파아지 λ의 좌향 프로모터 (pLλ프로모터)가 조절 부위로서 이용될 수 있다.

[0022] 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예: pSC101, ColE1, pBR322, pUC8/9, pHC79, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지 (예: λgt4 · λB, λ-Charon, λΔz1 및 M13 등) 또는 바이러스 (예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.

[0023] 한편, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터 (예: 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 tk 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.

[0024] 본 발명의 재조합 벡터는 바람직하게는 식물 발현 벡터이다.

[0025] 식물 발현 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 튜머파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*)와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부, 소위 T-영역을 식물 세포로 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 벡터이다. 다른 유형의 Ti-플라스미드 벡터 (EP 0 116 718 B1호 참조)는 현재 식물 세포, 또는 잡종 DNA를 식물의 게놈 내에 적당하게 삽입시키는 새로운 식물이 생산될 수 있는 원형질체로 잡종 DNA 서열을 전이시키는데 이용되고 있다. Ti-플라스미드 벡터의 특히 바람직한 형태는 EP 0 120 516 B1호 및 미국 특허 제4,940,838호에 청구된 바와 같은 소위 바이너리(binary) 벡터이다. 본 발명에 따른 유전자를 식물 숙주에 도입시키는데 이용될 수 있는 다른 적합한 벡터는 이중 가닥 식물 바이러스 (예를 들면, CaMV) 및 단일 가닥 바이러스, 게미니 바이러스 등으로부터 유래될 수 있는 것과 같은 바이러스 벡터, 예를 들면 비완전성 식물 바이러스 벡터로부터 선택될 수 있다. 그러한 벡터의 사용은 특히 식물 숙주를 적당하게 형질전환 하는 것이 어려울 때 유리할 수 있다.

[0026] 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함한다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 글리포세이트(glyphosate) 또는 포스피노트리신(phosphinotricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신, G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0027] 본 발명에 따른 식물 발현 벡터에서, 프로모터는 CaMV 35S, 액틴, 유비퀴틴, pEMU, MAS 또는 히스톤 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. "프로모터"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 말한다. "식물 프로모터"는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터이다. "구성적(constitutive) 프로모터"는 대부분의 환경 조건 및 발달 상태 또는 세포 분화하에서 활성이 있는 프로모터이다. 형질전환체의 선택이 각종 단계에서 각종 조직에 의해서 이루어질 수 있기 때문에 구성적 프로모터가 본 발명에서 바람직할 수 있다. 따라서, 구성적 프로모터는 선택 가능성을 제한하지 않는다.

[0028] 본 발명에 따른 식물 발현 벡터에서, 터미네이터는 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린합성효소(nopaline synthase, NOS), 벼 α-아밀라아제 RAmy1 A 터미네이터, 파세올린(phaseolin) 터미네이터, 아그로박테리움 튜머파시엔스의 옥토파인합성효소(Octopine synthase) 유전자의 터미네이터 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0029] 또한, 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주세포로서, 효모 (예컨대, *Saccharomyce cerevisiae*), 곤충세포, 사람세포 (예컨대, CHO 세포주(Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 및 식물 세포 등이 이용될 수 있으며, 바람직하게는 식물 세포이다.

[0030] 식물의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 그러한 형질전환 방법은 반드시 재생 및/(또는) 조직배양 기간을 가질 필요는 없다. 식물 종의 형질전환은 이제는 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물 양자를 포함한 식물 종에 대해 일반적이다. 원칙적으로, 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른 잡종 DNA를 적당한 선조 세포로 도입시키는데 이용될 수 있다. 방법은 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법(Krens et al., 1982, Nature 296: 72-74; Negrutiu et al., 1987, Plant Mol. Biol. 8: 363-373), 원형질체의 전기천공법(Shillito et al., 1985, Bio/Technol. 3: 1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법(Crossway et al.,

1986, Mol. Gen. Genet. 202: 179-185), 각종 식물 요소의(DNA 또는 RNA-코팅된) 입자 충격법(Klein et al.,1987, Nature 327: 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 투머파시엔스 매개된 유전자 전이에서(비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 방법은 아그로박테리움 매개된 DNA 전달을 포함한다. 특히 바람직한 것은 EPA 120 516호 및 미국 특허 제4,940,838호에 기재된 바와 같은 소위 바이너리 벡터 기술을 이용하는 것이다.

[0031] 본 발명은 또한, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 STA1 (STABILIZED1) 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물 세포를 형질전환하는 단계; 및 상기 형질전환된 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계;를 포함하는, 고온 스트레스 조건에서 식물체의 정상 종자 발달률 및 화분 생존율이 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0032] 본 발명의 제조 방법은 본 발명에 따른 애기장대 유래 STA1 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물 세포를 형질전환하는 단계를 포함하는데, 상기 형질전환은 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefiaciens*)에 의해 매개될 수 있다. 또한, 본 발명의 방법은 상기 형질전환된 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계를 포함한다. 형질전환 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다.

[0033] 식물의 형질전환에 이용되는 "식물 세포"는 어떤 식물 세포도 된다. 식물 세포는 배양 세포, 배양 조직, 배양 기관 또는 전체 식물, 바람직하게는 배양 세포, 배양 조직 또는 배양 기관 및 더욱 바람직하게는 배양 세포의 어떤 형태도 된다. "식물 조직"은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들면 이에 한정되진 않으나, 열매, 줄기, 잎, 꽃가루, 종자, 암 조직 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들, 즉 단일 세포, 원형질체(protoplast), 싹 및 캘러스 조직을 포함한다. 식물 조직은 인 플란타(in planta)이거나 기관 배양, 조직 배양 또는 세포 배양 상태일 수 있다.

[0034] 본 발명의 일 구현 예에 따른 형질전환 식물체의 제조 방법에 있어서, 상기 형질전환된 식물 세포에서 애기장대 유래 STA1 단백질 코딩 유전자의 발현을 증가시키면 비형질전환 식물체에 비해 고온 스트레스 조건에서 정상 종자의 발달률 및 화분 생존율이 증가된 형질전환 식물체를 제조할 수 있다.

[0035] 본 발명은 또한, 상기 방법에 의해 제조된 고온 스트레스 조건에서 정상 종자의 발달률 및 화분 생존율이 조절된 형질전환 식물체 및 이의 형질전환된 종자를 제공한다.

[0036] 전술한 것과 같이, 본 발명의 형질전환 식물체는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 STA1 단백질 코딩 유전자의 발현이 증가된 경우에 고온 스트레스 조건에서 정상 종자의 발달률 및 화분 생존율이 증가되는 것을 특징으로 한다.

[0037] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 식물체는 유채, 애기장대, 감자, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 샐러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갓무, 수박, 참외, 오이, 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩, 완두 등의 쌍자엽 식물 또는 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리, 양파 등의 단자엽 식물일 수 있고, 가장 바람직하게는 유채(*Brassica napus*) 식물체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0038] 본 발명은 또한, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 STA1 (STABILIZED1) 단백질 코딩 유전자를 유효성분으로 포함하는, 고온 스트레스 조건에서 식물체의 정상 종자 발달률 및 화분 생존율 조절용 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물은 유효 성분으로서 애기장대 유래 STA1 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하며, 상기 STA1 단백질 코딩 유전자를 식물체에 도입시켜 식물체의 고온 스트레스 조건에서의 정상 종자 발달률 및 화분 생존율을 조절할 수 있는 것이다. 바람직하게는 상기 애기장대 유래 STA1 단백질 코딩 유전자를 식물 세포에서 과발현시켜 식물체의 고온 스트레스 조건에서의 정상 종자 발달률 및 화분 생존율을 증가시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0040] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0042] **실시예 1. 애기장대 유래 *STA1* 유전자 과발현 유채 식물체의 제조**

[0043] 애기장대 유래 *STA1* 유전자 (*STABILIZED1*) 과발현을 위한 벡터를 만들기 위해 애기장대 유래 *STA1* 유전자의 CDS를 애기장대 Col-0 생태형의 게놈 DNA를 주형으로 하고 정방향 프라이머(STA1c_XbaI-F: 5'-TCGGTACCATGGTGTTTCTCTCGATTCC-3', 서열번호 3) 및 역방향 프라이머(STA1c_KpnI-R: 5'-AGGGTACCTCAAGCAGAATTCTCTTCCTT-3', 서열번호 4)를 사용하여 PCR로 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물을 *Xba*I, *Kpn*I 제한효소로 절단하여 수퍼 프로모터를 갖고있는 pBIB-Super 바이너리 벡터에 삽입하고, 상기 재조합 벡터를 아그로박테리움 튜메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101 균주에 형질전환하였다.

[0044] 야생형 유채의 씨앗을 1.5 ㎖ 튜브에 담아 0.01% Tween 20을 포함한 락스 용액에 5분간 소독하였다. 그 후 무균대에서 멸균수를 이용해 5회 정도 씻어낸 뒤 MOS 배지(Murashige and Skoog with vitamins, Caisson Laboratories INC, US, pH 5.7 ~ 5.8, 2% sucrose, 0.8% plant agar)에 20-30개 정도 씨앗을 심었다(150 mm x 20 mm, SPL 10150). 파라필름을 이용해 감은 뒤, 4℃에 2일간 처리 후 22℃로 옮겨 5일간 암처리하였다. 길게 자란 하배축을 무균대에서 7-10 mm 길이로 잘라 준비하였다.

[0045] 형질전환된 아그로박테리움은 25 ㎍/㎖ 카나마이신, 20 ㎍/㎖ 겐타마이신, 및 25 ㎍/㎖ 리팜피신을 포함하는 LB 액체 배지에 접종하여 28℃에서 2일간 배양하였다. 상기 형질전환된 아그로박테리움 배양액 100 ㎕를 25 ㎍/㎖ 카나마이신, 20 ㎍/㎖ 겐타마이신, 및 25 ㎍/㎖ 리팜피신을 포함하는 LB 액체 배지에 접종하여 28℃에서 2일간 배양한다. 상기 배양액을 6,000rpm에 10분간 원심분리하여 상층액은 버리고 10 ㎖ MSNB4 (3% sucrose, 4 mg/㎖ BA, 1 mg/㎖ NAA, pH 5.4) 용액에 현탁시켰다. 앞서 준비한 7-10 mm 길이의 유채 하배축을 아그로박테리움이 현탁된 MSNB4 용액에 넣고 암 조건에서 15분간 처리하였다. 그리고 고체 MSNB4 배지(3% sucrose, 4 mg/㎖ BA, 1 mg/㎖ NAA, plant agar 8.5 g/L, pH 5.4)에 옮겨 25℃에서 2일간 암배양하였다.

[0046] 형질전환된 아그로박테리움과 함께 배양된 야생형 유채 하배축은 500 mg/L 카르베니실린(carbenicillin)이 포함된 멸균수로 5회 정도 세척한 후, MSNB4CH10 고체 배지(3% sucrose, 4 mg/㎖ BA, 1 mg/㎖ NAA, $AgNO_3$ 4 mg/L, Carbenicillin 100 mg/L, Hygromycin 10 mg/L, plant agar 8.5 g/L, pH 5.4)에 하배축을 옮겨 22℃에 2주간 배양하였다.

[0047] 2주마다 캘러스를 새로운 MSNB4CH10 고체 배지로 옮겨서 잎의 재분화를 유도한 후, 잎이 일정 크기 이상 커지면 뿌리 유도 배지(1/2 MS, 2% sucrose, pH 5.8, plant agar 8.5 g/L, Carbenicillin 100 mg/L)로 옮겨 뿌리를 유도하였다. 뿌리가 자라면 흙으로 옮겨 순화 과정을 거친 후 형질전환체를 얻었다.

[0048] 형질전환체에서 다음 세대 씨앗을 받고, 하이그로마이신 함유 배지에서 키워 항생제 내성을 가지는 식물체만 선발하였다. 하이그로마이신에 내성을 가지는 형질전환체와 내성을 갖지 않은 형질전환체가 3:1 비율을 보이는 라인을 선별하여 흙으로 옮긴 뒤 다음 세대 씨앗을 받았다. 다음 세대 씨앗을 하이그로마이신 함유 배지에서 키워 100% 내성을 가지고 있는 라인을 선별하여 재조합 벡터가 안정적으로 삽입된 라인을 확립한다.

[0050] **실시예 2. 애기장대 유래 *STA1* 과발현 유채 식물체의 고온 스트레스 저항성 검정**

[0051] 애기장대 유래 *STA1* 과발현 유채의 생산량을 정상(비형질전환) 유채 식물체와 비교하였다. 정상 조건에서 정상 유채 식물체와 애기장대 유래 *STA1* 과발현 유채의 장각과(silique) 길이와 장각과 당 씨앗이 개수를 비교한 결과 큰 차이를 보이지 않는 것으로 확인되었다(도 1).

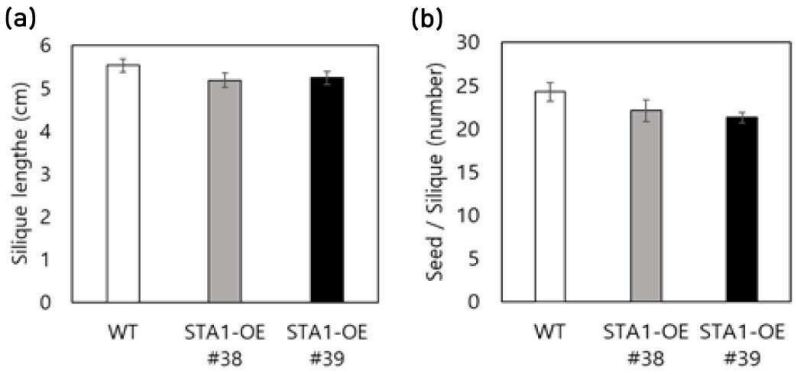
[0052] 또한, 고온 스트레스를 처리한 후, 정상 유채 식물체와 애기장대 유래 *STA1* 과발현 유채의 생산량을 비교하였다. 그 결과, 고온 처리 후 장각과의 길이는 정상 유채 식물체와 애기장대 유래 *STA1* 과발현 유채 사이에 큰 차이가 없었으며(도 2a), 장각과 당 씨앗의 수도 정상 유채 식물체와 큰 차이를 보이지 않았다(도 2b). 또한, 장각과 당 씨앗의 개수는 정상 유채 식물체와 애기장대 유래 *STA1* 과발현 유채에서 큰 차이를 보이지 않았지만, 정상 유채 식물체의 경우 비정상적으로 발달되는 씨앗의 개수가 애기장대 유래 *STA1* 과발현 유채보다 높은 것을 관찰하였다. 즉, 정상 유채 식물체의 고온 처리 후 비정상적인 씨앗의 비율은 10% 수준으로 확인된 반면, 애기장대 유래 *STA1* 과발현 유채의 경우 비정상적인 씨앗의 비율이 2% 정도로 확인되었다(도 2c 및 도 2d).

[0053] 또한, 고온 처리 후의 화분(pollen) 생존율을 관찰하였다. 간단하게, 고온 처리 후 형성되는 꽃을 Alexander 염색법(Peterson, R., et al., (2010) Int. J. Plant Biol. 1(2):e13)을 이용하여 염색한 뒤 화분을 현미경으로 관찰하였다. 그 결과 정상 유채 식물체에 비해 애기장대 유래 *STA1* 과발현 유채에서 화분 생존율이 더 높게 나타나는 것을 알 수 있었다(도 3).

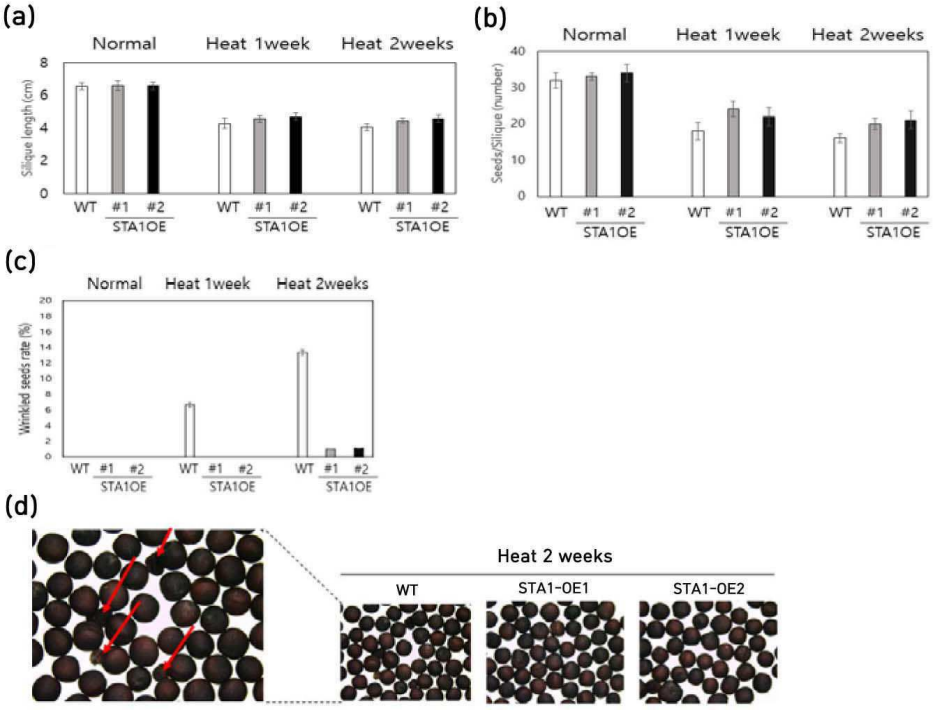
[0054] 상기 결과를 종합했을 때 애기장대 유래 *STA1* 과발현 유채가 고온 스트레스에 대한 높은 저항성을 보이며 특히, 생식생장과정에서 고온 스트레스에 대한 저항성이 증가되어, 생산량이 높게 나타났음을 알 수 있었다.

도면

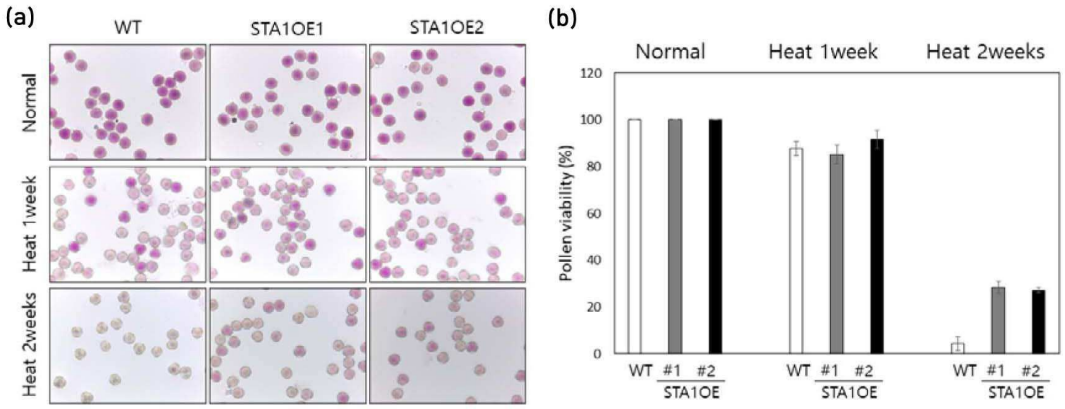
도면1



도면2



도면3



서 열 목 록

<110> SOGANG UNIVERSITY RESEARCH & BUSINESS DEVELOPMENT FOUNDATION

<120> STA1 gene from Arabidopsis thaliana regulating seed development and pollen viability under high temperature stress conditions in plant and uses thereof

<130> PN20170

<160> 4

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 3090

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

atggtgtttc tctcgattcc aaacgggaag actttatcga tcgacgtgaa ccctaattca 60

accaccatct ccgccttcga acaattggcc caccaacgta gtgatgttcc acaatctttc 120

cttcgttact ctctccgtat gcgaaaccct agccgcgtgt ttgtagattc aaaggattcc 180

gattcgatct tattgtccga tctcggtgtt tctcgtttct ctactgtgat tatccatgtc 240

ctgcttttgg gtggtatgca agcggctccg ccgaagcctc gtcttgattt cctcaattct 300

aagcctccgt caaattatgt agcgggtttg ggtcgtggtg ctactgggtt tactactcga 360

tctgatattg gtcctgctcg tgctgctccg gatcttcctg atcggtctgc tttggctaca 420

gcggctgctc caggagtagg tcgtggagca gggaagccaa gtgaagcgga agcggaggac 480

gatgaagaag ctgaggagaa aaggtacgat gagaatcaga cgtttgatga gtttgaaggg 540

aatgatgttg gtttgttcgc taatgctgag tacgatgagg atgataaaga ggctgatgcc 600

atctgggagt ctattgatca gaggatggat tcgaggagga aagatcggag agaagcgaag 660

ctgaaggaag aaatcgagaa ataccgagcc tcgaacccta agattactga gcagtttgcg 720

gatttgaaga ggaaattaca cactttgtct gcggatgagt gggatagtat tcctgagatt 780

ggggattact cgctgaggaa caagaagaag aagtttgaga gctttgtgcc tattcctgat 840

acgcttttgg agaaggcgaa gaaagaaaag gagcttgtca tggccttaga cccaaagagc 900

agagccgctg gtgggtcgga gacaccatgg gggcagacgc cggtgacaga cttgactgct 960

gtcggtgagg gaagaggtac ggtgttgtct ctgaagcttg ataacctatc agattcagtt 1020

tcggggcaaa ctgtagtgga tcctaaaggc tacttaactg acctgaagag tatgaaaaga 1080

accactgatg aagagatata cgatcgcaat agagctagat tgttatacaa gagtctgacc 1140

cagtcgaatc caaagaatcc aaatggctgg attgctgctg ctagagtgga ggaggtggat 1200

gggaagatta aagcagctag gtttcagatt cagaggggct gcgaagagtg cccgaaaaat 1260

gaggatgttt ggcttgaagc ttgtaggtta gctaatccag aagatgccaa gggggttatt 1320

gcgaagggag ttaagctgat acccaattca gtgaagctat ggttggaggc tgcaaagctg 1380

gagcatgatg tggagaacaa gagtagggtg ttgagaaagg gactggaaca tattccagac 1440

tctgtaagac tatggaaggc tgttgttgag ttggctaatg aggaggatgc aaggattttg 1500

cttcacaggg ctgtggagtg ctgcccttg catctggagc tatgggtggc acttgcgagg 1560

ctcgaaacat atgctgaatc aaagaaggtg ttgaacaaag cgagagagaa gctcccaaag 1620

gagcctgcaa tttggatcac cgctgctaag ttagaagaag ctaatgggaa gctagatgaa 1680

gctaatgata acacggctat ggtgggaaag attattgata ggggtataaa gactctccag 1740

agagaagggg ttgttattga ccgagaaaat tggatgagtg aggctgaggc atgtgagaga 1800

gttggatctg tcgctacatg ccaggccatt attaagaaca caataggtat tggagtggaa 1860

gaagaggata gaaagagaac ttgggttgct gatgcagatg agtgcaagaa gaggggttcc 1920

attgagaccg caagagcaat atacgcccat gctcttagtg tattcttgac caagaaaagt 1980

atctggctta aagcggcgca gcttgagaag agccatggga gtcgggagtc ccttgatgcc 2040

ttgttgcgta aggctgtaac atatgtcccg caagctgagg ttctctggct catgggtgcc 2100

aaagagaagt ggctcgctgg agatgttcca gcagcccgtg ctattctaca agaggcttat 2160

gctgcaattc ccaactctga ggaaatctgg cttgctgctt tcaagcttga gtttgagaac 2220

aaggagccgg agagggcaag aatgctgctt gcaaaagcaa gggaaagagg agggactgaa 2280

agggtctgga tgaaatcagc cattgttgag agagaacttg gcaacgtaga ggaggagagg 2340

agattgctta atgaaggttt gaagcaattc ccaacattct tcaagctttg gttaatgctt 2400

gggcagctcg aggaacggtt caagcatcta gaacaggcca ggaaagctta tgacactggt 2460

ttgaagcact gtccccactg cataccactg tggctctcac tcgctgatct tgaagagaaa 2520

gtgaatgggc taaacaaagc tcgggctatt ctcaccacgg ccaggaagaa gaatcctggg 2580

ggggctgagc tatggttagc tgctattcgc gctgaactga ggcatgacaa caagagagaa 2640

gcagagcact tgatgtcaaa ggctctgcaa gactgtccca agagtggtat cctctgggct 2700

gcggacattg agatggcgcc acgtcctcga cggaaaacaa agagtattga tgctatgaag 2760

aagtgtgatc gcgaccctca tgtcaccata gctgttgcca agctcttttg gcaagacaag 2820

aaggtggaga aagccagagc atggtttgaa cgtgctgtta ccgttggccc agatattggc 2880

gatttctggg cgttgttcta caaatttgaa cttcaacatg gctctgatga ggacaggaag 2940

gaagttgtgg cgaagtgtgt agcttgtgag ccgaagcatg gcgagaaatg gcaagccatc 3000

tccaaagcgg ttgaaaatgc tcaccagcct attgaagtta tcttgaagag agttgtgaat 3060

gcgttgagca aggaagagaa ttctgcttga 3090

<210> 2

<211> 1029

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

Met Val Phe Leu Ser Ile Pro Asn Gly Lys Thr Leu Ser Ile Asp Val
1 5 10 15

Asn Pro Asn Ser Thr Thr Ile Ser Ala Phe Glu Gln Leu Ala His Gln
20 25 30

Arg Ser Asp Val Pro Gln Ser Phe Leu Arg Tyr Ser Leu Arg Met Arg
35 40 45

Asn Pro Ser Arg Val Phe Val Asp Ser Lys Asp Ser Asp Ser Ile Leu
50 55 60

Leu Ser Asp Leu Gly Val Ser Arg Phe Ser Thr Val Ile Ile His Val
65 70 75 80

Leu Leu Leu Gly Gly Met Gln Ala Ala Pro Pro Lys Pro Arg Leu Asp
85 90 95

Phe Leu Asn Ser Lys Pro Pro Ser Asn Tyr Val Ala Gly Leu Gly Arg
100 105 110

Gly Ala Thr Gly Phe Thr Thr Arg Ser Asp Ile Gly Pro Ala Arg Ala

115 120 125

Ala Pro Asp Leu Pro Asp Arg Ser Ala Leu Ala Thr Ala Ala Ala Pro

130 135 140

Gly Val Gly Arg Gly Ala Gly Lys Pro Ser Glu Ala Glu Ala Glu Asp

145 150 155 160

Asp Glu Glu Ala Glu Glu Lys Arg Tyr Asp Glu Asn Gln Thr Phe Asp

165 170 175

Glu Phe Glu Gly Asn Asp Val Gly Leu Phe Ala Asn Ala Glu Tyr Asp

180 185 190

Glu Asp Asp Lys Glu Ala Asp Ala Ile Trp Glu Ser Ile Asp Gln Arg

195 200 205

Met Asp Ser Arg Arg Lys Asp Arg Arg Glu Ala Lys Leu Lys Glu Glu

210 215 220

Ile Glu Lys Tyr Arg Ala Ser Asn Pro Lys Ile Thr Glu Gln Phe Ala

225 230 235 240

Asp Leu Lys Arg Lys Leu His Thr Leu Ser Ala Asp Glu Trp Asp Ser

245 250 255

Ile Pro Glu Ile Gly Asp Tyr Ser Leu Arg Asn Lys Lys Lys Lys Phe

260 265 270

Glu Ser Phe Val Pro Ile Pro Asp Thr Leu Leu Glu Lys Ala Lys Lys

275 280 285

Glu Lys Glu Leu Val Met Ala Leu Asp Pro Lys Ser Arg Ala Ala Gly

290 295 300

Gly Ser Glu Thr Pro Trp Gly Gln Thr Pro Val Thr Asp Leu Thr Ala

305 310 315 320

Val Gly Glu Gly Arg Gly Thr Val Leu Ser Leu Lys Leu Asp Asn Leu

325 330 335

Ser Asp Ser Val Ser Gly Gln Thr Val Val Asp Pro Lys Gly Tyr Leu

340 345 350

Thr Asp Leu Lys Ser Met Lys Arg Thr Thr Asp Glu Glu Ile Tyr Asp

355 360 365

Arg Asn Arg Ala Arg Leu Leu Tyr Lys Ser Leu Thr Gln Ser Asn Pro

370 375 380

Lys Asn Pro Asn Gly Trp Ile Ala Ala Ala Arg Val Glu Glu Val Asp

385 390 395 400

Gly Lys Ile Lys Ala Ala Arg Phe Gln Ile Gln Arg Gly Cys Glu Glu

405 410 415

Cys Pro Lys Asn Glu Asp Val Trp Leu Glu Ala Cys Arg Leu Ala Asn

420 425 430

Pro Glu Asp Ala Lys Gly Val Ile Ala Lys Gly Val Lys Leu Ile Pro

435 440 445

Asn Ser Val Lys Leu Trp Leu Glu Ala Ala Lys Leu Glu His Asp Val

450 455 460

Glu Asn Lys Ser Arg Val Leu Arg Lys Gly Leu Glu His Ile Pro Asp

465 470 475 480

Ser Val Arg Leu Trp Lys Ala Val Val Glu Leu Ala Asn Glu Glu Asp

485 490 495

Ala Arg Ile Leu Leu His Arg Ala Val Glu Cys Cys Pro Leu His Leu

500 505 510

Glu Leu Trp Val Ala Leu Ala Arg Leu Glu Thr Tyr Ala Glu Ser Lys

515 520 525

Lys Val Leu Asn Lys Ala Arg Glu Lys Leu Pro Lys Glu Pro Ala Ile

530 535 540

Trp Ile Thr Ala Ala Lys Leu Glu Glu Ala Asn Gly Lys Leu Asp Glu

545 550 555 560

Ala Asn Asp Asn Thr Ala Met Val Gly Lys Ile Ile Asp Arg Gly Ile

565 570 575

Lys Thr Leu Gln Arg Glu Gly Val Val Ile Asp Arg Glu Asn Trp Met

580 585 590

Ser Glu Ala Glu Ala Cys Glu Arg Val Gly Ser Val Ala Thr Cys Gln

595 600 605

Ala Ile Ile Lys Asn Thr Ile Gly Ile Gly Val Glu Glu Glu Asp Arg

610 615 620

Lys Arg Thr Trp Val Ala Asp Ala Asp Glu Cys Lys Lys Arg Gly Ser
625 630 635 640
Ile Glu Thr Ala Arg Ala Ile Tyr Ala His Ala Leu Ser Val Phe Leu
645 650 655
Thr Lys Lys Ser Ile Trp Leu Lys Ala Ala Gln Leu Glu Lys Ser His
660 665 670
Gly Ser Arg Glu Ser Leu Asp Ala Leu Leu Arg Lys Ala Val Thr Tyr
675 680 685
Val Pro Gln Ala Glu Val Leu Trp Leu Met Gly Ala Lys Glu Lys Trp

690 695 700
Leu Ala Gly Asp Val Pro Ala Ala Arg Ala Ile Leu Gln Glu Ala Tyr
705 710 715 720
Ala Ala Ile Pro Asn Ser Glu Glu Ile Trp Leu Ala Ala Phe Lys Leu
725 730 735
Glu Phe Glu Asn Lys Glu Pro Glu Arg Ala Arg Met Leu Leu Ala Lys
740 745 750
Ala Arg Glu Arg Gly Gly Thr Glu Arg Val Trp Met Lys Ser Ala Ile
755 760 765

Val Glu Arg Glu Leu Gly Asn Val Glu Glu Glu Arg Arg Leu Leu Asn
770 775 780
Glu Gly Leu Lys Gln Phe Pro Thr Phe Phe Lys Leu Trp Leu Met Leu
785 790 795 800
Gly Gln Leu Glu Glu Arg Phe Lys His Leu Glu Gln Ala Arg Lys Ala
805 810 815
Tyr Asp Thr Gly Leu Lys His Cys Pro His Cys Ile Pro Leu Trp Leu
820 825 830
Ser Leu Ala Asp Leu Glu Glu Lys Val Asn Gly Leu Asn Lys Ala Arg

835 840 845
Ala Ile Leu Thr Thr Ala Arg Lys Lys Asn Pro Gly Gly Ala Glu Leu
850 855 860
Trp Leu Ala Ala Ile Arg Ala Glu Leu Arg His Asp Asn Lys Arg Glu
865 870 875 880

Ala Glu His Leu Met Ser Lys Ala Leu Gln Asp Cys Pro Lys Ser Gly
885 890 895
Ile Leu Trp Ala Ala Asp Ile Glu Met Ala Pro Arg Pro Arg Arg Lys
900 905 910

Thr Lys Ser Ile Asp Ala Met Lys Lys Cys Asp Arg Asp Pro His Val
915 920 925
Thr Ile Ala Val Ala Lys Leu Phe Trp Gln Asp Lys Lys Val Glu Lys
930 935 940
Ala Arg Ala Trp Phe Glu Arg Ala Val Thr Val Gly Pro Asp Ile Gly
945 950 955 960
Asp Phe Trp Ala Leu Phe Tyr Lys Phe Glu Leu Gln His Gly Ser Asp
965 970 975
Glu Asp Arg Lys Glu Val Val Ala Lys Cys Val Ala Cys Glu Pro Lys

980 985 990
His Gly Glu Lys Trp Gln Ala Ile Ser Lys Ala Val Glu Asn Ala His
995 1000 1005
Gln Pro Ile Glu Val Ile Leu Lys Arg Val Val Asn Ala Leu Ser Lys
1010 1015 1020
Glu Glu Asn Ser Ala
1025

<210> 3
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 3
tcggtaccat ggtgtttctc tcgattcc 28

<210> 4
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer

<400> 4

agggtacctc aagcagaatt ctcttcctt 29